

Rhodococcus属細菌におけるトレハロース脂質生合成機構の解析

著者	稲葉 知大
内容記述	この博士論文は内容の要約のみの公開（または一部非公開）になっています
発行年	2015
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2014
報告番号	12102甲第7352号
URL	http://hdl.handle.net/2241/00133914

Rhodococcus 属細菌における
トレハロース脂質生合成機構の解析

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士(農学)学位論文

稲葉 知大

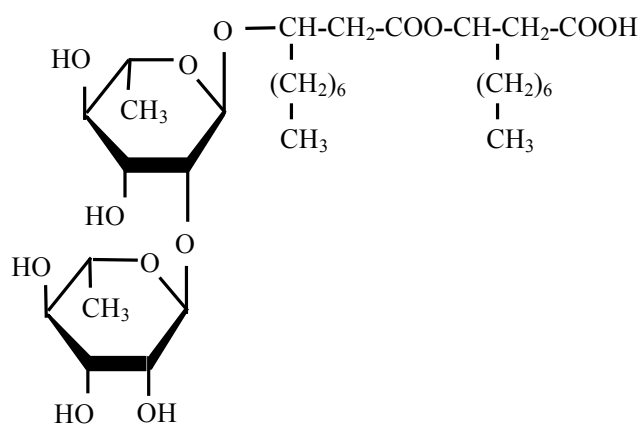
目次

第1章	序論	1
第2章	STL 生産関連遺伝子の特定	7
第1節	はじめに	7
第2節	材料および方法	7
第3節	結果および考察	14
第3章	STL 生合成遺伝子の解析と遺伝子発現改変	17
第1節	はじめに	17
第2節	材料および方法	17
第3節	結果および考察	21
第4章	総括	33
	引用文献	37
	謝辞	40
	付記	41

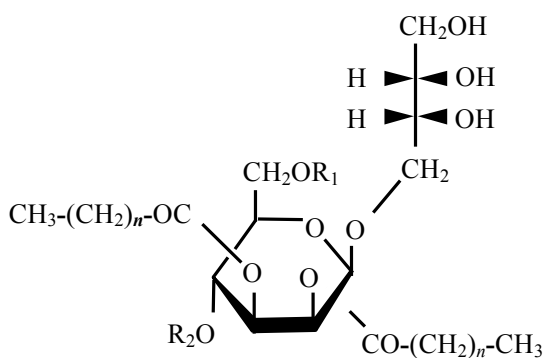
第1章 序論

(1) バイオサーファクタントとは

炭化水素を原料とする発酵産業は石油発酵と呼ばれ、1960年代から盛んに研究が行われてきた。この研究の過程で、ある種の微生物が界面活性能を持つ物質を大量に生産し、菌体外へと分泌している事が明らかとなった。このような界面活性物質はバイオサーファクタントと呼ばれ、現在では数多くの微生物がこうした物質を生産する事が知られている(1-4)(図1-1)。バイオサーファクタントは化学合成品に比べて高い界面活性能を持つ事が多く、少量で持続的な効果を及ぼす事が特徴として知られる。さらに低毒性かつ生分解性といった生態由来であるが故の特徴を持ち、低環境負荷な界面活性剤としての応用が期待されてきた(1-4)。その主たる用途は化学合成界面活性剤の代替品であり、既に何例か実用化に至っている。しかし近年の研究により、バイオサーファクタントにはさらに多岐にわたる機能が存在する事が発見され、現在では様々な分野での応用研究が進められている。いくつか例を挙げると、環境分野では石油の三次回収、石油貯留槽の洗浄、石油輸送パイプラインにおける重油の減粘といった石油産業を始めとし、土壌や海洋といった場所での石油汚染のバイオレメディエーションといった環境分野への応用研究が進められている(5,6)。こうした応用研究はバイオサーファクタントの生分解性や物理的な界面活性作用に着目して行われてきたが、近年の研究によりバイオサーファクタントには様々な生理活性がある事が明らかとなってきた。バイオサーファクタントの持つ生理活性作用として抗腫瘍活性や抗ウイルス活性などが知られており(7-9)、現在バイオサーファクタントは薬理活性を持つ物質としてもその実用化が望まれている。

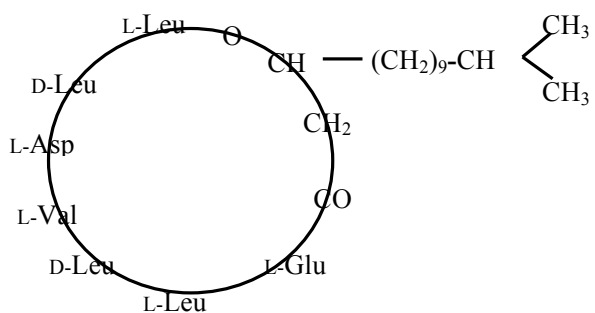


Rhamnolipid



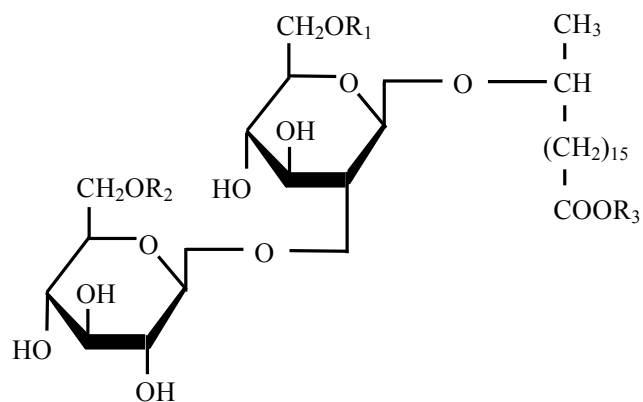
Mannnosyl
Erythrytol Lipid(MEL)

MEL-A : $R_1=R_2=\text{acetyl}$
MEL-B : $R_1=\text{acetyl}, R_2=\text{H}$
MEL-C : $R_1=\text{H}, R_2=\text{acetyl}$
 $n = 6 \sim 10$



Surfactin

$L\text{-Leu}$: L-ロイシン
 $D\text{-Leu}$: D-ロイシン
 $L\text{-Asp}$: L-アスパラギン酸
 $L\text{-Val}$: L-バリン
 $L\text{-Glu}$: L-グルタミン酸



Sophorolipid

$R_1, R_2 = \text{H or acetyl}$
 $R_3 = \text{H or methyl}$

図 1-1 バイオサーファクタントの構造

(2) トレハロース脂質について

トレハロース脂質はそうしたバイオサーファクタントの一つであり，一般的に *Rhodococcus* 属や *Mycobacterium* 属によって生産される (10)．トレハロース脂質を生産する細菌は数多く知られており，その構造の骨格となるのはトレハロース残基とそれにエステル結合した長鎖の脂肪酸である．トレハロースに結合する官能基やアシル基の種類により数多くのトレハロース脂質が生産されるが，その多くが高い界面活性作用を有し，様々な生理活性作用を示す事が近年の研究により明らかとなってきた (10)．当研究室において炭化水素を資化する細菌として分離された *Rhododoccus* sp. SD-74 株も大量のトレハロース脂質を菌体外に分泌する事が見出され (11)，このトレハロース脂質は Succinoyl trehalose lipid: STL (3,4-di-O-alkanoyl-2,2'-di-O-succinoyl- α , α -trehalose)と命名された (12) (図 1-2)．

Rhodococcus sp. TB-42 株は，中鎖脂肪酸を疎水基とするトレハロース脂質(STL-3)を生産し，その鎖長は基質によらずほぼ一定 ($C_7 \sim C_{11}$)である (13)．その一方で SD-74 株のトレハロース脂質(STL-1)に導入される脂肪酸は，基質として与えた炭化水素と同じ鎖長のものが大部分を占める (14)．加えて分子内にハロゲン化やエーテル結合が存在する炭化水素を STL の基質として用いた場合，それらは官能基ごとそのまま STL に導入される (14)．この能力は，基質により STL の疎水基の構造をある程度自由に制御できることを示唆している．様々な側鎖を持ったバイオサーファクタントを選択的に生産できることは，他の菌株にはみられない SD-74 株特有の非常に優れた形質である．STL の新たな使用用途が開発されれば，構造に依存するその機能を改善し，発展，さらには強化させることも期待される．

また STL は分子内に多数の作用点 (カルボキシル基，水酸基)を持つために，ベンガラ(Fe_2O_3)やカーボンブラックといった固体粒子に対して著しく大きな分散および分散の安定化作用を有することが報告された (14)．さらに，他のトレハロース脂質に見られるように STL にも生理活性が存在する．現在までに，STL はヒト白血病細胞を分化誘導することが明らかになっている (15)．以上のように STL は，界面活性剤，医薬品，高機能素材と，様々な分野への応用が期待されている．なおかつ，基質による構造の制御を行える点で，他のバイオサーファクタントとは異なる．生産量も 10 日間で 40 g/l (16) とバイオサーファクタントの中では比較的高い．

上述のように，SD-74 株の生産する STL はその高い将来性から実用化が非常に期待されるバイオサーファクタントである．しかしながら STL をはじめとするバイオサーファクタントの実用化には解決しなければならないいくつかの課題が存在する．

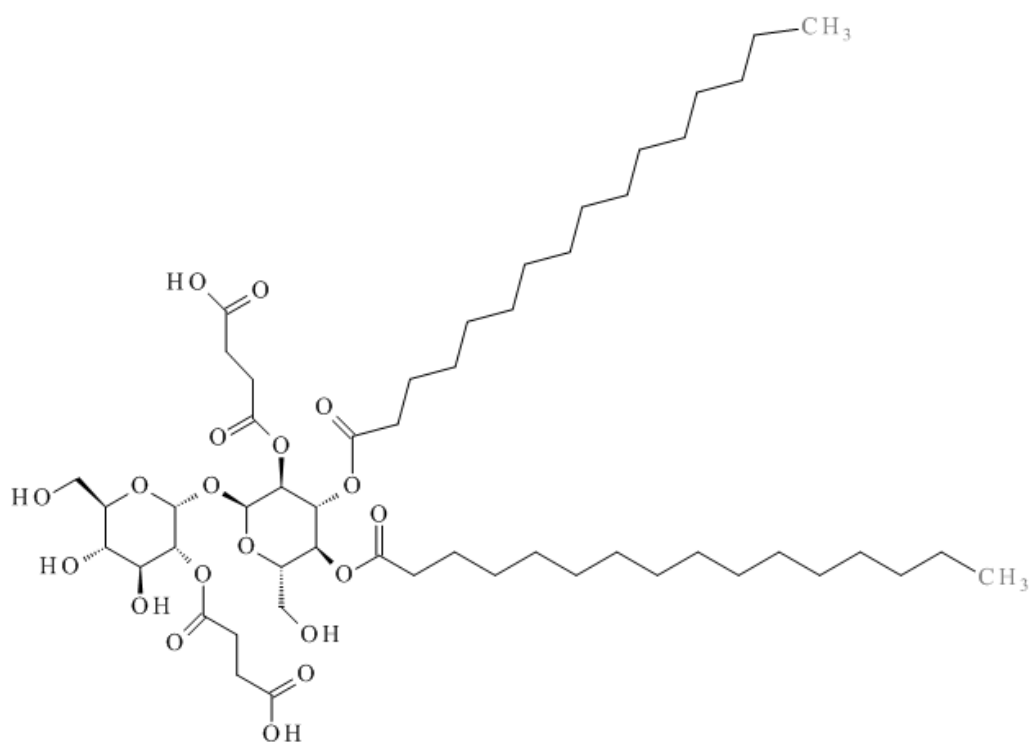


図 1-2 STL-1 の構造(12)

(3) バイオサーファクタント実用化に向けての課題

私たちが日常使用している商品に含まれる界面活性剤は、ほぼ全てが化学合成界面活性剤である (13)。バイオサーファクタントはその生産コストが化学合成界面活性剤の数倍から数十倍高く、実用化された例は数例である (1)。近年ようやく実用化された例として、低刺激性の化粧品原料として生産、販売が開始されたサーファクチンナトリウム (商品名「アミノフェクト」、昭和電工株式会社)、食器洗い機用洗剤のソホロリピッド (商品名「ソホロン」、サラヤ株式会社) が挙げられる。図 1-1 にサーファクチン、ソホロリピッドの構造を示した。これらはいずれも高生産性を有する菌株の分離と培養条件の検討を重ね、生産効率を向上させることによって商業ベースでの生産が実現されている。バイオサーファクタントの構造は非常に複雑であり、化学合成による製造は現状では実現不可能である。したがって、バイオサーファクタントを何らかの用途で用いる場合は微生物菌体を利用した生産方法を採用より他に方法は無い。一般にバイオサーファクタント生産菌の多くは非常に生産効率が低く、実用化に際して大きな障壁となっている。こうした低い生産性に加え、生産コストを押し上げる要因として副産物の生成が挙げられ、目的物質の分離精製段階でかかるコストは総コストの半分以上、時に 90% に達するケースもある (1)。

このようなバイオサーファクタント特有の問題は、STL にも同様に存在する。STL の対原料収率は 50%程度であり、生産効率も 40 g/l と他のバイオサーファクタント生産菌に比べれば格段に多いが、実用化を考える上では決して十分ではない。STL の実用化には、最低でも対原料収率 70%、生産量 100 g/L が目標と試算されている (1)。また、現在 STL の生合成経路は不明であり、野生株そのものを使用して生産を行うため副次的に生産される STL-1 の誘導体の生成を厳密にコントロールする事が出来ない。この問題は、STL の医薬化粧品といった高機能素材としての利用に大きな障害となる。

このような背景から、これまで、STL の生産効率の向上、遺伝子改変や合成酵素の利用による STL の合成を目指し、STL の生合成経路を解明する必要がある。

(4) トレハロース脂質合成のモデルとしての応用

近年、微生物由来酵素を用いたトレハロースの生産手法が確立され、トレハロースの大量生産が可能となった (17)。トレハロースの生産量は年間 2 万トンに達し (2000 年)、その利用は食品産業を中心として急速に広がっている。これはトレハロースが高い保水力をはじめとする他の糖にはみられない優れた特性を有するためであり (18)、今後もその利用は増加することが予想される。この一方で、トレハロースに脂肪酸を付加し、その脂溶性を高める研究が行われている (19, 20)。脂溶性を高めることにより、化粧品

等，様々な分野への応用が可能になると期待されている．このトレハロースに脂肪酸を付加するという反応は STL 合成反応と合致する．このため，STL の生合成経路を明らかにし，STL 合成酵素を特定する事で有用なトレハロース修飾酵素を取得できる可能性が高い．

トレハロース脂質の多くは *Rhodococcus* 属細菌によって生産されており，この生合成経路を特定する事は *Rhodococcus* 属細菌におけるトレハロース脂質発酵のモデル系の構築にも繋がる，重要な研究である．そこで本研究では，STL の生合成経路を明らかにするために研究を行った．

第2章 STL 生産関連遺伝子の特定

第1節 はじめに

微生物における特定の代謝産物の生合成経路は、その経路が途中で遮断され代謝産物を生産しなくなった変異株を用いて研究を進めるのが一般的である (21)。本章では、STL 生合成経路の解析を行うため、トランスポゾンを用いた SD-74 株の変異株集団の作成を行った。さらに作成された変異株集団より STL の生産能力を欠失した変異株 (STL 非生産株) の探索を行う事で、STL の生産に必須な遺伝子の特定を行った。

第2節 材料および方法

(1) 菌株およびプラスミド

トランスポゾンライブラリの構築には、供試菌株として *Rhodococcus* sp. SD-74 株の野生株を使用した。全 DNA 調製には *Rhodococcus* sp. SD-74 株の野生株、および取得された STL 非生産株を用いた。クローニングを行う際の宿主として *Escherichia coli* JM109 (*recA1*, *supE44*, *endA1*, *hsdR17*, *gryA96*, *relA1*, *thi*, $\Delta(lac-proAB)$ / F'[*traD36*, *proAB*⁺, *lacI*^f, *lacZ* Δ M15]), *E. coli* DH5 α (*supE44*, $\Delta lacU169$ ($\phi 80 lacZ$ Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gryA96*, *thi-1*, *relA1*) および *E. coli* S17-1 (*pro thi hsdR recA* Tp^r Sm^r; chromosome::RP4-2 Tc::Mu-Km::Tn7)を用いた。また、クローニングベクターとして pBluescript II SK(+), pSMT3 (22), pG19II および pUC19 を用いた。

(2) 試薬

トランスポゾンは EZ::TN <KAN2> Tnp Transposome Kit (Epicentre) を用いた。また、以降の実験で用いた試薬や器具などはすべてオートクレーブやフィルター処理、乾熱処理により無菌状態、または Nuclease free として使用した。またポリメラーゼ、制限酵素等のクローニングに使用した酵素は、宝酒造株式会社、東洋紡績株式会社製のものを用いた。シークエンスには、Big Dye terminator v.3.1 (Applied Biosystems)を用いた。試料調製、反応条件等は全てマニュアルに従った。

STL の検出はアンスロン硫酸法により行った。アンスロン硫酸試薬は、0.2 g のアン

スロンに 75%硫酸 100 ml を加え調製した．STL を検出する薄層クロマトグラフィーにおけるポジティブコントロールには，精製された STL を用いた．

(3) 培地

形質転換法には PMY 培地 (23) を用いた．また，プレート培養時には 1.5% (w/v) の寒天を加えた．培地は全てオートクレーブにより 121°C, 15 分間の滅菌操作を行った後に使用した．1 次スクリーニングでは PMY 培地に *n*-Hexadecane を 10% となるように添加して用いた．2 次スクリーニングでは FPY 培地 (24) を用いた．それぞれの培地には必要に応じて 50 µg/ml Kanamycin もしくは Hygromycin を加えた．*E. coli* の通常の培養には，Luria-Bertani(LB)培地(Difco)を用いた．必要に応じて 50 µg/ml Kanamycin もしくは Hygromycin を加えた．また，プレート培養時には 1.5% (w/v) の寒天を加えた．*E. coli* の形質転換時には，SOB 培地 (SOB medium, Difco) を用いた．培地は 121°C, 15 分間のオートクレーブ操作により滅菌した後に使用した．今後特に表記のない場合，変異株の培養には適切な濃度の Kanamycin もしくは Hygromycin を加えた培地を用いた．

(4) 形質転換法

形質転換はエレクトロポレーション法 (25, 26) に準じて行った．

SD-74 株を PMY 培地 5 ml に一白金耳植菌し，30°C，220 rpm で 2 日間培養した．培養液 1 ml を PMY 培地 100 ml に入れ，30°C，200 rpm で 2 日間，OD₆₆₀=0.6 となるまで培養した．培養終了後，4°C，3,000 rpm で 6 分間遠心分離し，集菌した．菌体に冷滅菌水を加え洗浄し，再び遠心分離した．この洗浄作業をさらに 2 回行った．洗浄の終わった菌体を 500 µl の冷滅菌水に懸濁した．菌液を 100 µl ずつマイクロチューブに分注し，これにトランスポゾーム(20 ng/µl)を 1 µl を加え混合した．氷中に 10 分置いた後，電極間隔 0.1 cm のセルキューベットに移し，パルスを与えた (パルス設定：2.0 kV，25 µF，400 Ω)．パルス後直ちに PMY 培地を 900 µl 加え，30°C，200 rpm で 2 時間インキュベートした．菌液を 100 µl ずつ，40 µg/ml の Kanamycin を含む PMY プレートに塗布し，30°C で 3 日間培養した．生育してきたコロニーをもう一度 50 µg/ml の Kanamycin を含む PMY プレートに塗布し，破壊株の選別を行った．

(5) Growth 法による 1 次スクリーニング

PMY 培地 900 μ l を 24 穴マイクロプレートの各穴に加え、*n*-Hexadecane 100 μ l を添加した。変異株を楊枝で釣菌し、30°C、500 rpm で 6 日間培養した。6 日後、生育状況を目視により確認した後、各穴から培養液 500 μ l を小試験管に取り、Ethylacetate を 500 μ l 加えボルテックスし、STL を抽出した。酢酸エチル層を TLC プレートに 5 μ l スポットし、Chloroform:Methanol:H₂O (65:25:4, v/v/v) の混合溶媒で展開した。TLC プレートにアンスロン硫酸試薬をスプレーし、105°C で 10 分加熱して STL の検出を行った。STL のスポットの消失した株を STL 非生産候補株として取得した。

(6) 休止菌体法による STL 非生産菌株の 2 次スクリーニング

FPY 培地 50 ml に SD-74 株、変異株をそれぞれ植菌し、30°C、200 rpm で 4 日間培養した。4 日後、生育を目視により確認した後に培養液を 4°C、3000 rpm で 6 分間遠心分離して集菌した。集菌した菌体を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) で 1 回洗浄した後に、同緩衝液に懸濁し 24 ml とした。この菌液に 1 M KH₂PO₄-K₂HPO₄ (pH 8.0) と *n*-Hexadecane を 3 ml ずつ添加し、30°C、200 rpm で 4 日間休止菌体反応を行った[休止菌体反応液 : 0.04 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M KH₂PO₄-K₂HPO₄ (pH 8.0), 10% (fin. conc.) *n*-Hexadecane]。

4 日後、休止菌体反応液水層を分取し、6 N HCl を 1 ml を加え pH を 3 以下にした後、Ethylacetate を 30 ml 加え STL を抽出した。その後 TLC にて STL の検出を行い、STL のスポットの消失した株を STL 非生変異株として取得した。

(7) 全 DNA の抽出

以下に示す方法により、全 DNA を調製した (27)。

野生株、STL 非生産株を FPY 培地 10 ml に植菌し、30°C、220 rpm で 2 日間培養した。この培養液を 4°C、4,500 rpm で 12 分間遠心分離し、集菌した。菌体を SET バッファー [75 mM NaCl, 25 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)] で 1 回洗浄した後に、5 mg/ml の卵白リゾチームを含む SET buffer 5 ml に懸濁した。この菌液を 37°C で振とうしながら 1 時間インキュベートした。その後、Proteinase K を 5 mg、SDS を 0.1 g 加え、さらに 60°C で振とうしながら 2 時間インキュベートした。5 M NaCl を 2 ml 加え室温になるまで静置し、Chloroform 5 ml を添加して 4°C で振とうしながら 30 分間インキュベートした。

これを 4°C, 4,500 rpm で 12 分間遠心分離して上清を回収し, 0.6 容の Isopropanol を添加して, -20°C で 1 時間静置した. これを 4°C, 8000 rpm で 15 分間遠心分離した. 沈殿を 70%エタノールで洗浄し, 風乾した. 20 µg/ml の RNaseA を含む TE 50 µl を加え, 37°C で 1 時間インキュベートした後, フェノール-クロロホルム抽出を行い, エタノール沈殿を行った. 沈殿を減圧下で乾燥後, TE に溶解した.

(8) トランスポゾン (Km^r遺伝子) を含む DNA 断片のクローニング

STL 非生産株の全 DNA は PCR 法でトランスポゾン挿入の確認を行った. PCR 反応は 98°C 20 sec, 68°C 1 min 30 cycle の 2step で行った. 以降の実験で用いた全てのプライマーを表 2-2-1 に示す. トランスポゾンの挿入が確認された STL 非生産株の全 DNA に対して制限酵素 *Apal*, *KpnI*, *SacI* で完全分解した後, フェノール-クロロホルム抽出を行い, エタノール沈殿を行った. pBluescriptII SK(+)は制限酵素 *Apal*, *KpnI*, *SacI* で完全分解した後, 精製を行ったものを使用した. 同じ制限酵素で切断した STL 非生産株の DNA 断片 500 ng と pBluescriptII SK(+) 50 ng を, T4 DNA Ligase (Invitrogen) で結合させた. 反応液は酵素に添付されている専用バッファーを用いて, 全量を 20 µl として調製した. 反応は 16°C で 12 時間行った. 反応終了後にエタノール沈澱を行い, 得られた反応産物を *E. coli* に導入する供与 DNA とした. 調製した供与 DNA を, *E. coli* DH5α へ, 以下に示すエレクトロポレーション法により導入した. LB 培地に LB プレート上の *E. coli* のシングルコロニーを植菌し, 37°C で一晩前培養した. 培養液を LB 培地 80 ml に 200 µl 加え, 37°C, 200 rpm で OD_{600nm}=0.55 となるまで培養した. 培養終了後, 4°C, 6,500 rpm で 10 分間遠心分離し, 集菌した. 菌体に冷滅菌水を加え洗浄し, 再び遠心分離した. この洗浄作業をさらに 1 回行い, 最後に 10% Glycerol で洗浄した後, 菌体を 1 ml の 10% Glycerol に懸濁した. 菌液を 42 µl ずつマイクロチューブに分注し, ドライアイス中で急冷した後, -80°C で保存した. これを *E. coli* のコンピテントセルとした. 氷中で融解した *E. coli* コンピテントセルに供与 DNA 2 µl を加え混合した. 電極間隔 0.2 cm のセルキューベットに移し, パルスを与えた (パルス設定: 2.5 kV, 25 µF, 200 Ω). パルス後直ちに SOC 培地 600 µl 加え, 37°C, 200 rpm で 1 時間インキュベートした. 菌液

を 50 µg/ml のカナマイシンを含む LB プレートに塗布し、37°C で一晚培養して目的の DNA 断片をもつ形質転換体を選択した。

(9) サイクルシーケンス反応

破壊断片を含むプラスミドをテンプレートとし、サイクルシーケンス反応を行った。反応には Big Dye terminator (Applied Biosystems)を用いた。サイクルシーケンス反応は 96°C 1min 1cycle, 96°C 10 sec-60°C 4 min × 25 cycle で行った。反応終了後、この試料に対してエタノール沈殿を行い、Hi-Di formamide に溶解し、シーケンス解析を行った。シーケンス用サンプルを Genetic Analyzer 310 (Applied Biosystems) に供して、塩基配列を決定した。得られた塩基配列のデータを、National Center for Biotechnology Information (NCBI) "BLAST" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)を用い、SD-74 株の draft genome sequence データとの比較を行う事で周辺領域の決定および ORF の推定を行った。

(10) STL 生産必須遺伝子の相補および破壊

トランスポゾンの挿入による遺伝子の破壊が、ゲノム上の一カ所にのみ起こっている事を確認するために、トランスポゾンが挿入されていると推定される ORF の破壊および相補を行った。破壊用プラスミドは inverse PCR による Km^r 遺伝子の挿入により作成した。まず SD-74 株の Total DNA を鋳型として、ORF 全体約 1500bp を増幅した。続いて、増幅断片を pUC19 の MCS 中にクローニングした。構築したプラスミドを ORF の内側から外側に向かって増幅するプライマーを用いて PCR を行った。増幅断片の両端に付加した制限酵素タグにより、Km^r 遺伝子を ORF 内部へと挿入した。こうして得られた遺伝子破壊断片を増幅し、接合伝達用プラスミド pG19II の MCS 中にクローニングした。続いて構築したプラスミドを SD-74 株に接合伝達させることにより、ORF の破壊を行った。接合伝達は、Robert らの手法 (28) を参考にして行った。まず構築したプラスミドを *E. coli* S17-1 株にエレクトロポレーション法により導入し、50µg/ml の Kanamycin を含む LB プレートに塗布した。12 時間後、コロニーの生えたプレートを室温にて更に 24 時間培養した。これと並行し SD-74 株をグリセロールストックより、30

μg/ml の Nalidixic acid を含む LBP プレート (1% Bacto-peptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, w/v) におこし, 5 日間培養してコロニーを形成させた. それぞれのプレートに LBP 液体培地を 1.5 ml 加え, コロニーを懸濁した. それぞれの懸濁液を 750 μl ずつ混合し, 遠心してペレットを形成させた. ペレットを LBP 液体培地 1ml で懸濁し, 200 μl ずつ LBP プレートに塗布して 30°C で一晩おいて conjugation を促した. LBP 培地 2ml でプレート上の菌体を懸濁し, 懸濁液を 100 μl ずつ, 30 μg/ml の Nalidixic acid と 200 μg/ml の Kanamycin を含む LBP プレートに塗布し, 6 日間培養してコロニーを形成させた. 得られた菌株から Total DNA を抽出し, 抽出した DNA を鋳型として, ORF の増幅に用いたプライマー対を用いて PCR を行った. プラスミドが組みこまれたことを確認後, 菌株を定常期まで培養し, PMY プレート, 10% (w/v) の Sucrose を含む PMY プレート, 15 μg/ml の Gentamycin を含む PMY プレートに, 希釈段階を作製して 100 μl ずつ塗布した. 10% (w/v) のスクロースを含む PMY プレートでコロニーを形成した菌株を破壊株とした. 続いて, 作成した破壊株に対して開始コドンから終止コドンまでの ORF をクローニングし, 相補を行った. 相補は, ORF を *E. coli-Mycobacterium* shuttle vector である pSMT3 の MCS 内にクローニングしたベクターを破壊株に導入する事で行った. 作成した破壊株および相補株は休止菌体法による STL 生産試験を行い, 相補および破壊の確認を行った.

表 2-2-1 使用したプラスミド

Oligonucleotide	Sequence (5' to 3')	Purpose	Reference
KAN-2 FP-1	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC	Sequence analysis of all strains	This study
KAN-2 RP-1	GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG	Sequence analysis of all strains	This study
M13 R	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	Sequence analysis strain 330	This study
2d-RP3	TGGAAGGTACCTGGATGGC	Sequence analysis strain 330	This study
3c-RP3	TGGTCATCGCGCTCGGTG	Sequence analysis strain 330	This study
3c-RP4	TCACCACCAGCGCACCGC	Sequence analysis strain 330	This study
6b-FP3	ACCGGGGTGGTCAGCTCG	Sequence analysis strain 330	This study
6b-FP4	TGCGTTACCGGGTGACCG	Sequence analysis strain 330	This study
4b-FP3	GACGACTGGTCGTGCCCCG	Sequence analysis strain 1510	This study
4b-FP4	CCGTCACCGTTCTCGAGG	Sequence analysis strain 1510	This study
4c-RP3	GATGCTCCAGTGCGTGGTG	Sequence analysis strain 1510	This study
4c-RP4	TCCTGTCTCGCCACAGGG	Sequence analysis strain 1510	This study
1d-RP3	GGCGAATTCGCCAGTGCG	Sequence analysis strain 1608	This study
1d-RP4	GTCGGGCCTGTTGTTCCC	Sequence analysis strain 1608	This study
16S rRNA 400F	ACGAAGCGTGAGTGACGGTA	Quantification of 16S rRNA	This study
16S rRNA 500RV	ACTCAAGTCTGCCCGTATCG	Quantification of 16S rRNA	29
RT-ORF1-200F	CCGACGGACAAGTCCAATGC	Quantification of ORF1	29
RT-ORF1-200RV	CGACACCGTGTGCTCGATCG	Quantification of ORF1	This study
RT-alkB-200F	GCATGGCTGATGACCTCG	Quantification of alkB	This study
RT-alkB-200RV	GCACAGGCGATCACTGTTCC	Quantification of alkB	This study
RT-fda-200F	CGAGAAGGGCAAGTACCTGC	Quantification of fda	This study
RT-fda-160RV	CGTGGAAGACGAAGTCGAACG	Quantification of fda	This study
ORF1-F	CCCAAGCTTGAGCAACTGCATCGACACCG	Complementation of ORF1	This study
ORF1-Rv	CCCAAGCTTGGGTTCCTCGGTAGATCGAACG	Complementation of ORF1	This study
alkB-F	CGGGATCCGGTCAACGACGCGATATCTTAC	Complementation of <i>alkB</i>	This study
alkB-Rv	CCCAAGCTTGCAAGTCTTTTCGACACAGCC	Complementation of alkB	This study
fda-F	CGGGATCCGATGTTGCCGAGGAAGTAGC	Complementation of <i>fda</i>	This study
fda-Rv	CCCAAGCTTGTCTGAAACCGGTGTCAGCTCGC	Complementation of fda	This study
D191-A_FM	GTGTGCGCGTGAGCGATCGCATGGAAGAG	Point mutation of D191A	This study
D191-A_RM	CTCTTCCATGCGATCGCTCACGCGCACAC	Point mutation of D191A	This study
H192-A_FM	GTCGGTGTGCGCGGCATCGATCGC	Point mutation of H192A	This study
H192-A_RM	GCGATCGATGCCGCGCACACCGAC	Point mutation of H192A	This study
D196-A_FM	CGACTGCATGGCGGTGTGCGCG	Point mutation of D196A	This study
D196-A_RM	CGCGCACACCGCCATGCACTCG	Point mutation of D196A	This study
exp-fda-F	GGAATTCATATGCCAATTGCGACTCCCCAGGTCTACG	Expression of Fda and Fda-His	This study
exp-fda-Rv	CGCAAGCTTGTCTCGCGACACCGAGCGTCC	Expression of Fda	This study
exp-fda-Rv-His	CGCAAGCTTTCAGCTCGCGGACACCGAGCGTCC	Expression of Fda-His	This study
Km_r_F	AACTGCAGGCAGGTAGCTTGCAGTGGGC	Amprification of Km resistant cassette	This study
Km_r_Rv	GCTCTAGATCCCGCTCAGAAGAACTCGTC	Amprification of Km resistant cassette	This study
HK_F	CCCAAGCTTCCGCGGCGAGTGCTGACCCG	Disruption of histidine kinase	This study
HK_Rv	CGGAATTCGCGGGCGGTCTGGTCTCGG	Disruption of histidine kinase	This study
inv_HK_F	AACTGCAGACGGGCCACTCGCTCGGCGG	Disruption of histidine kinase	This study
inv_HK_Rv	GCTCTAGAGACGACCTGACCCCGATCC	Disruption of histidine kinase	This study
comp_HK_F	AACTGCAGATGCGCCCGGTGCACGAGATG	Complementation of hisitidine kinase	This study
comp_HK_Rv	CCCAAGCTTGCTGTCAACGGGGCTCCGCG	Complementation of hisitidine kinase	This study

第3節 結果および考察

4つの遺伝子が STL の生産に必須である。 トランスポゾームによる変異導入により合計で約 4500 株の形質転換体を取得した。取得された形質転換体を以後トランスポゾンライブラリとして STL 非生産株の探索に用いた。一次スクリーニングにより、合計で 25 株の STL 非生産株候補を取得した。これらの変異株が生育能の著しい低下により STL 生産能力を欠いた可能性を排除するため、休止菌体法を用いた 2 次スクリーニングを行った。その結果、7 株の STL 非生産株(strains 330, 1510, 1598, 1608, 1646, 2120, A141)を取得する事に成功した。

トランスポゾンライブラリより得られた STL 非生産株のシーケンス解析により、7 株の STL 非生産株(strains 330, 1510, 1598, 1608, 1646, 2120, A141)の内、「1510 株と 1598 株」、「1608 株と 1646 株、2120 株」についてはそれぞれ同じ ORF と推定される箇所にトランスポゾンが挿入されていた。そこで今後は 330 株、1510 株、1608 株 STL 非生産株とした（図 2-3-1）。それぞれの遺伝子は、acyl-CoA transferase like gene (330)および、alkane monooxygenase (1510), fructose bisphosphate aldolase (1608)と推定される遺伝子が破壊されていた。これらの遺伝子はそれぞれ脂質合成、脂質代謝、糖新生に関わる事から STL の直接の合成に必須な遺伝子であると推定された。また、A141 株については two component regulatory system の sensor histidine kinase にトランスポゾンが挿入されており、STL の生産制御に関与する可能性が示された。さらにこの sensor histidine kinase はペアとして働く response regulatr の ORF と重なって存在していたため、sensor histidine kinase のみを再度破壊し相補を行った（図 2-3-2）。トランスポゾンを用いた解析により、3 種類の STL の合成に関与する可能性を持つ遺伝子および、1 種類の STL 生産制御に関与する可能性を持つ遺伝子が特定された。次章より、それぞれの遺伝子について、その機能を生合成と生産制御について切り分け、解析を行った結果を示す。

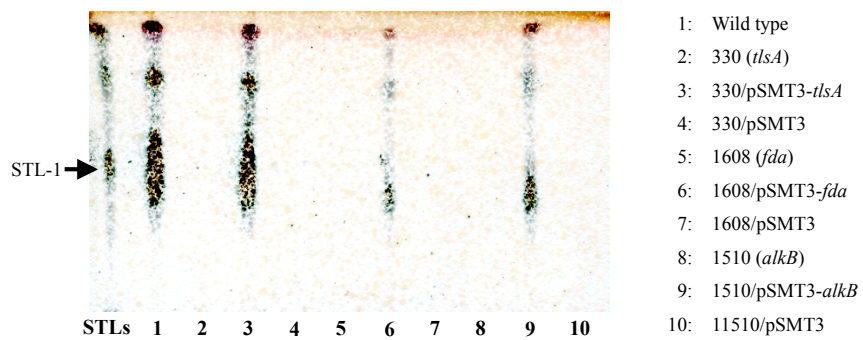


図 2-3-1 トランスポゾンライブラリの STL 生産試験

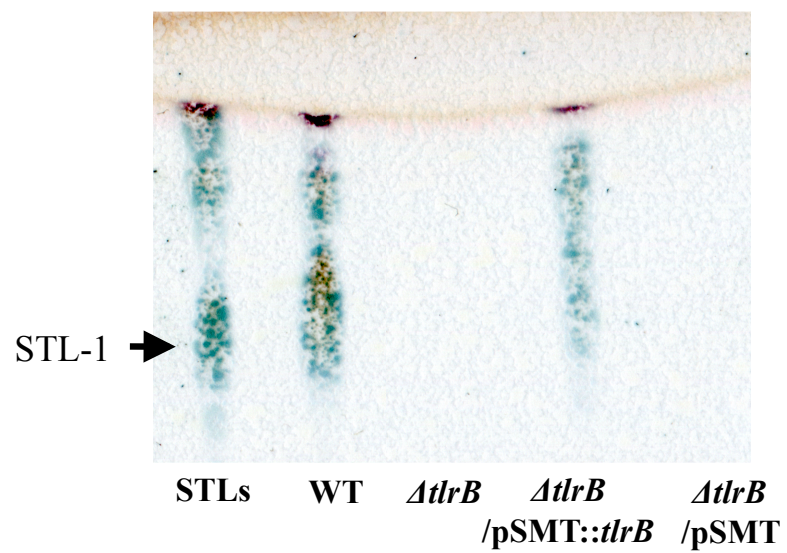


図 2-3-2 sensor histidine kinase 破壊株の STL 生産試験

第3章 STL 生合成遺伝子の解析

第1節 はじめに

第2章で取得された STL 非生産株のうち3株(330, 1510, 1608 株)は, STL の生合成自体に必須な遺伝子である可能性が示された. これまで *Rhodococcus* 属において, STL の様なトレハロース脂質の生合成に関わる遺伝子は発見されていなかった. そこで本章ではトレハロース脂質の生合成に関して, 遺伝子レベルでその生合成に関する知見を得る事を目的として実験を行った.

第2節 材料および方法

(11) 菌株および培地

この章で用いた細菌およびプラスミドについては表 3-2-1 に示す. *Rhodococcus* 属細菌については前述の PMY 培地および FPY 培地を用いて培養を行い, 必要に応じて抗生物質を添加した. 大腸菌については LB 培地を用いて培養を行った.

(12) 組換え Fda タンパク質の生産および精製

SD-74 株の染色体より *fda* の配列を増幅し, His-tag 付タンパク質発現ベクター pET21b ヘクローニングを行った. 作製した *fda* 発現ベクターを *E.coli* BL21(DE3)に導入し, *fda* 大量発現用大腸菌株を作製した. この株を LB 4ml (+CBPC 50 µg/ml)で一晩前培養を行った. 前培養した菌液 100 µl を LB 20 ml (+CBPC50 µg/ml)に植菌して 37°C, 200 rpm で振盪培養を行った. 波長 600 nm での培養液の吸光度が 0.8 となった時点で IPTG を 0.1 mM の濃度で添加し, 20°C で 3 時間誘導を行った. この際にネガティブコントロールとして IPTG を加えない系も同時に行った.

誘導反応後, 培養液 1 ml をエッペンチューブに移し, 遠心分離により上清を除いた後, Buffer I 500 µl で懸濁した. 懸濁液は氷冷しながらソニケーター (Dr. Hielscher 社製 UP50H) で Amplitude 80%, Cycle 0.75 の条件で, 1 分間の破碎を 2 回行った. 破碎後, 15000 rpm で 1 分間遠心し, 未破碎菌体を除いた上清を粗酵素液とした.

Fda が発現したか否かについては, 粗酵素液を sodium dodecylsulphate-polyacryl-amide gel electrophoresis (SDS-PAGE)に供することにより行った. 粗酵素液 200 µl と 2×Sample Buffer 200 µl を混合し, 98°C で 3 分間加熱した後, 10 µl をアクリルアミド濃度 10%のゲルを用いて泳動を行った. 泳動の際の分子量マーカーには, 第一製薬株式会社製タンパク質分子量マーカー「第一」を用いた. 泳動後のゲルは, Bio-Rad社製 Bio-Safe Coomassie を用いて染色を

行った.

また, His-tag 融合タンパク質に関しては, TOYOBO 社製 MagExtractor^R -His-tag-を用いて行った. 精製タンパク質は, 粗酵素液と同時に SDS-PAGE に供した.

(13) アルドラーゼ活性の測定

Fructose-1,6-bisphosphate aldolase 活性は, Fructose-1,6-bisphosphate を基質とした coupled assay によって測定した (30). 本手法では, まず aldolase により Fructose-1,6-bisphosphate から glyceraldehyde-3-phosphate と dihydroxyacetone-phosphate への開裂をおこさせる. 形成された glyceraldehyde-3-phosphate は系内の Triosephosphate isomerase により dihydroxyacetone-phosphate となる. こうして 1 分子の Fructose-1,6-bisphosphate から生じた 2 分子の dihydroxyacetone-phosphate は, 系内の α -Glycerolphosphate dehydrogenase によって L-Glycerol-3-phosphate となる. この反応は NADH を還元剤として用いるため, NADH の減少を波長 340nm の吸光度の減少として測定することにより aldolase 活性が検出できる. 酵素活性は, 1 分間に 1 μ mol の fructose-1,6-bisphosphate を解裂させるのに必要な酵素量を 1 ユニット (U)と規定する.

実際の測定では, 25°C で保温しておいた 1 ml の Fda 活性測定試薬を吸光光度計のセルキュベットに移し, 調整した粗酵素液 10 μ l を加えてよく攪拌した後, 波長 340 nm の吸光度の減少を 10 分間測定した.

(14) TlsA の H_{X3}D_{X14}Y モチーフへの点変異導入

H_{X3}D_{X14}Y モチーフへの点変異導入は Overlap extension PCR により行った (31). 前章に示したプライマーを用いて, 192 番目の Histidine を Alanine に, 196 番目の Aspartic acid を Alanine にそれぞれ置換した. 変異された配列はシーケンス解析により確認した後, pSMT3 へクローニングした. 構築したプラスミドは 330 株 (Δ *tlsA*) へと導入し, STL の生産能を調べた.

(15) 全 RNA 抽出

全 RNA の抽出は対数増殖期初期から中期にかけての菌体を用いて行った. 供試菌を 10 ml の PMY 培地 (10% Hexadecane) に植菌し, 30°C、200 rpm で 24 時間培養し、培養液全量より集菌を行った. 集菌した菌体を 1 ml の LETS buffer (0.1 M LiCl, 0.01 M EDTA, 0.01 M Tris-Cl (pH 7.4), 0.2 % SDS, 0.1 %) に懸濁し、当量の Phenol Chloroform Isoamylalcohol (PCI) および約 500 ml glass beads を加え、室温で 4 分間ボルテックスミキサーにより菌体の破砕を行った. その後上清を再度 PCI で抽出し、エタノール沈殿後

に rDNaseI (TAKARA) 20U による処理を 2 度行ったものを全 RNA として今後の試験に用いた。

(16) cDNA 合成

Real-time RT-PCR に用いる cDNA は上述の DNaseI 処理後の全 RNA を材料として、SuperScript[®]III RNase H⁻Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いた逆転写反応により調整した。

(17) Real-time RT-PCR 解析

PCR 反応は 95°C 10 秒、60°C 1 秒、72°C 12 秒を 1 サイクルとし、45 サイクルで行われた。メルティングカーブ解析は 0.2°C/sec で 50°C から 95°C まで行い、増幅産物が目的の DNA 断片であることを確認した。16S rRNA 遺伝子をハウスキーピング遺伝子として用いて、その他の遺伝子の発現量を比較した。なお、Real-time PCR に用いたプライマーは前章にて示した。

表 3-2-1 使用した菌株およびプラスミド

Bacterial strains or plasmid	Relevant properties	Source or reference
Strains		
<i>Rhodococcus</i> sp.		
SD-74	Wild type	This study
330	STLs productivity deficient Tn mutant	This study
1510	STLs productivity deficient Tn mutant	This study
1608	STLs productivity deficient Tn mutant	This study
<i>E. coli</i>		
DH5 α	F ⁻ Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>U169 recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁺ m _K ⁺) <i>supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA relA1</i>	TaKaRa
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) F ⁺ [<i>traD36 proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δ M15]	TakaRa
BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B, F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> _B (r _B ⁺ m _B ⁺) <i>gal</i> (DE3)	TaKaRa
Plasmid		
pBluescript II SK +	cloning vector Amp ^r	Stratagene
pSMT3	<i>Rhodococcus-E. coli</i> shuttle vector Hg ^r	22
pSMT3- <i>tlsA</i>	pSMST3 derivative carrying the <i>traT</i> gene	This study
pSMT3- <i>fda</i>	pSMST3 derivative carrying the <i>fda</i> gene	This study
pSMT3- <i>alkB</i>	pSMST3 derivative carrying the <i>alkB</i> gene	This study
pSMT3- <i>traT</i> -D191A	pSMT3 derivative carrying the mutant <i>tlsA</i> D191A	This study
pSMT3- <i>traT</i> -H192A	pSMT3 derivative carrying the mutant <i>tlsA</i> H192A	This study
pSMT3- <i>traT</i> -D196A	pSMT3 derivative carrying the mutant <i>tlsA</i> D196A	This study
pSTM3-P _{alkB}	pSMT3 derivative carrying the <i>alkB</i> promoter	This study
pSMT3-P _{alkB} :: <i>tlsA</i>	pSMT3 derivative for <i>traT</i> overexpression	This study
pSMT3-P _{alkB} :: <i>fda</i>	pSMT3 derivative for <i>fda</i> overexpression	This study
pET21b	Apr His tag, T7 promoter	Novagen
pET21b- <i>fda</i>	pET21b derivatives; <i>Fda</i> expression vector	This study
pET21b- <i>fda</i> -His	pET21b derivatives; <i>Fda</i> -His expression vector	This study

第3節 結果および考察

糖合成が STL の生産に関与する．シーケンス解析により 1608 株は fructose bisphosphate aldolase (*fda*) 遺伝子に相同性を示す 2,033-bp の ORF にトランスポゾンの挿入が確認された (Accession No. AB847085)．この ORF の開始コドンは GTG で、予測された Shine-Dalgarno (SD) 配列 (GGAGG) は開始コドンの 9 bp 上流に存在していた．アミノ酸配列では *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Corynebacterium glutamicum*, *Streptomyces glutamicum* の Fda に対してそれぞれ 76%, 71%, 61% の相同性を示した．Fructose bisphosphate aldolase はトリオースとヘキソースの変換を行う酵素である．つまり 1608 株は fructose の合成能を欠いているために STL の生産が不能となっている可能性が考えられた．そこで休止菌体反応液中に fructose を加える事で Fda 機能の相補を試みた．その結果 fructose の添加は 1608 株の STL 生産能を回復させた (図 3-3-1)．

次に、Fda の機能を確認するため、組換えタンパク質を用いた Fda 酵素活性の測定を試みた．Fda および His タグ融合 Fda (Fda-His) の発現は大腸菌 BL21(DE3) 株を用いて行い、精製後のタンパク質の確認は SDS-PAGE によって行った (図 3-3-2)．SD-74 株の配列情報から予測される Fda の分子量は 36.7 kDa であったが、Fda-His は His タグの融合によりわずかに分子量が増加していた．精製の結果、Fda-His のシングルバンドが得られ、この融合タンパク質を用いて aldolase 活性の測定を行った．その結果、非誘導コントロールが aldolase 活性を示さなかったのに対し、誘導後のサンプルは aldolase 活性を示した．特に精製された Fda-His (1,330 mU/mg protein) は粗精製の Fda-His (213 mU/mg protein) に比べて高い aldolase 活性を示した．Native な Fda の粗精製液は粗精製の Fda-His と同程度の aldolase 活性を有していた (256 mU/mg protein)．この結果は Fda に付加された His タグは Fda の活性に影響を与えていない事を示している．Fda が aldolase 活性を有し、さらには Fructose の添加により STL の生産能が回復したことから、Fda は fructose bisphosphate aldolase 活性を持つことが確かめられた．この機能より、Fda は STL の生合成時に *n*-alkane からのトレハロース基の合成、供給を行っている事が予想された．

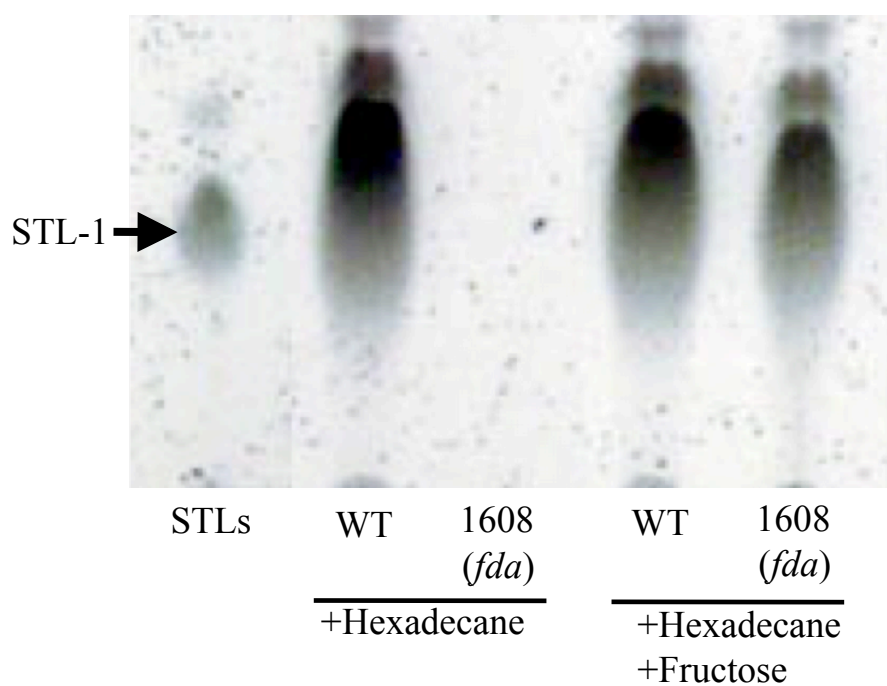


図 3-3-1 Fructose 添加による STL 生産能の相補. 休止菌体反応時に 10% *n*-Hexadecane に加え, 1% w/v の Fructose を加えて STL 生産試験を行った (井上修論 2003 より引用, 編集).

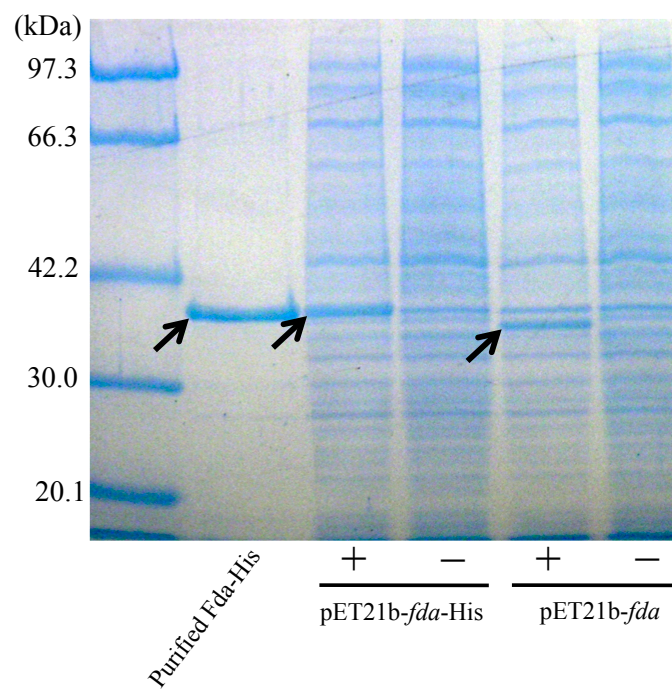


図 3-3-2 Fda-His 精製タンパク質の SDS-PAGE 解析.
矢印はそれぞれの Fda タンパク質を示す. SDS-PAGE 解析は 0.1 mM IPTG の添加 (+), 非添加 (-) のサンプルを用いて行った.

Alkane monooxygenase は STL 生産条件下においてアルカン代謝に必須である。1510 株のシーケンス解析の結果、トランスポゾン は 1,188-bp の ORF からなる alkane monooxygenase (*alkB*) 遺伝子に挿入されている事が明らかとなった (Accession no. AB847086)。この ORF の開始コドンは GTG でその 7-bp 上流には SD 配列と予測される配列が存在した (GGAGG)。Alkane monooxygenase の機能を持つタンパク質には共通するモチーフである Hist-1 box [HE(L/M)XHK], Hist-2 box [EHXXGHH], Hist-3 box [LQRH(S/A)DHHA], HYG motif [NYXEHYG(L/M)]が存在し, *alkB* についても同様のモチーフが存在している事が明らかとなった(表 3-3-1)。アミノ酸配列では *Rhodococcus* sp. strain Q15 の alkane-1-monooxygenase (*alkB1*)および *Rhodococcus erythropolis* NRRLB-16531 の *alkB1* に対して 82%の高い相同性を示した。

これらの結果は *alkB* がアルカンの酸化酵素である可能性を強く示唆しており, 1510 株は供給される *n*-Alkane を *n*-Alcohol に変換できないために STL の生産能が失われている可能性が考えられた。そこで 1510 株に対し, *n*-Hexadecane の代わりに *n*-Hexadecanol を加え休止菌体反応を行った。その結果, アルコールの添加は STL の生産能を回復させた (図 3-3-3)。この結果は *alkB* が alkane monooxygenase としての機能を持つ事を強く示唆しており, *alkB* の欠失は *n*-Alkane からの STL 生産において *n*-Alkane 利用のための初発酸化に必須である可能性を支持している。

表 3-3-1 alkane monooxygenase^a のアミノ酸アラインメント

Protein	Residues	Sequence	Residues
AlkB1-Q15	131	GVTAGIGINTA <u>HELGHK</u> KESVERWLSKIVLAQSA YGHFYI <u>EHNRGHH</u> VRVSTPEDPATSRFGETLYGFWP	198
AlkB2-Q15	147	GCVAGIGINTA <u>HELGHK</u> KDDLERWLSKITLAQSFYGHFYI <u>EHNRGHH</u> VRVATPEDPASSRFGESFWTFLP	216
AlkB1-1653I	131	GVTAGIGINTA <u>HELGHK</u> KESVERWLSKIVLAQSA YGHFYI <u>EHNRGHH</u> VRVSTPEDPATSRFGETLYGFWP	198
AlkB2-1653I	147	GCVAGIGINTA <u>HELGHK</u> KDDLERWLSKITLAQSFYGHFYI <u>EHNRGHH</u> VRVATPEDPASSRFGESFWTFLP	216
AlkB-H37Rv	150	GVLGVGINTA <u>HEMGHK</u> KDSL ERWLSKITLAQTCYGHFYI <u>EHNRGHH</u> VRVSTPEDPASARFGETLWEFLP	219
AlkM-ADP1	143	GAINGIAVNTA <u>HELSHK</u> ADRLDHILSHLALVPTGYNHFRI <u>EHPYGHH</u> KRAATPEDPASSQMGETFYEFWP	208
AlkB-GPo1	136	GIVNGLALNTG <u>HELGHK</u> KETFD RWMAKIVLAVVGYGHFFI <u>EHNKGHH</u> RDVATPMDPATSRMGESIYKFSI	196
AlkB-SD74	131	GVTAGIGINTA <u>HELGHK</u> KENLERWLSKIVLAQSA YGHFYI <u>EHNRGHH</u> VRVSTPEDPASSRFGESFYRFWP	198
AlkB1-Q15	199	RSVGGGLKSAVHLEKTRFERLGTTHWSIKN——DVLNAWLSVVLFGVALAVFGIGIAPYLVIAQAFIGF	264
AlkB2-Q15	217	RSVWGLRSSWSLEKARLDRLGKKPWT——I—RNGVLHSWLSVVLFGVLVAVFGLSVLPFLVLQAVFGF	282
AlkB1-1653I	199	RSVGGGLKSAVHLEKTRFERLGTTHWSIKN——DVLNAWLSVVLFGVALAVFGIGIAPYLVIAQAFIGF	264
AlkB2-1653I	217	RSVWGLRSSWSLEKARLDRLGKKPWT——I—RNDVLHSWLSVVLFGVLVAVFGLSVLPFLVLQAVFGF	282
AlkB-H37Rv	220	RSVIGGLRSVHLEAQRRLRLGVSPWNPMTYLRNDVLNAWLSVVLWGGLIAVFGPALIPFVITQAVFGF	289
AlkM-ADP1	209	RTVFGSLKSAIEIETHRLKRGKKFWSKDNEL——LQGWMGSAAFHSSIIAIFGKGTIPYLVTAQFYGI	274
AlkB-GPo1	197	REIPGAFIRAWGLEEQRLSRGQSVWSFDNEILQPMI——ITVILYAVLLALFGPKMLVFLPIQMAFGW	262
AlkB-SD74	199	RSVAGGLKSAVHLEKARFERLGTTHWSIKN——DVLNAWLMTLVLF GAVVAAFGIGILPYVL IAQAVIGF	264
AlkB1-Q15	265	SLLEAI <u>NYLEHYGL</u> LRQKTASGRYERCTPAHSWNSDRICTNVFLYH <u>LQRHSDHHA</u> NPTRRYQALRSMEEA	334
AlkB2-Q15	283	CLLETV <u>NYLEHYGL</u> KRRRLDSGRYERAAPEHSWNSDHICTNIFLYH <u>LQRHSDHHA</u> NPTRRYQTLRSMIGA	352
AlkB1-1653I	265	SLLEAI <u>NYLEHYGL</u> LRQKTASGRYERCTPAHSWNSDRICTNVFLYH <u>LQRHSDHHA</u> NPTRRYQALRSMEEA	334
AlkB2-1653I	283	CLLETV <u>NYLEHYGL</u> KRRRLDSGRYERAAPEHSWNSDHICTNIFLYH <u>LQRHSDHHA</u> NPTRRYQTLRSMIGA	352
AlkB-H37Rv	290	SLLEAV <u>NYLEHYGL</u> LRQKSANGRYERCAPVHSWNSDHIVTNLFLYH <u>LQRHSDHHA</u> NPTRRYQTLRSMAGA	359
AlkM-ADP1	275	SLFEI <u>NYIEHYGL</u> KRQKRADGNVERTMPHSWNNNIVTNLFLYQ <u>LQRHSDHHA</u> VPTRPFQALRHFDEA	344
AlkB-GPo1	263	WQLTSA <u>NYIEHYGL</u> LRQKMEDGRYEHQKPHHSWNSNHIVSNLYLFLH <u>LQRHSDHHA</u> HPTRSYQSLRDFPGL	332
AlkB-SD74	265	SLLEAI <u>NYLEHYGL</u> LRQKTASGRYERCTPAHSWNSDRICTNVFLYH <u>LQRHSDHHA</u> NPTRRYQTLRSMIGA	334

^a AlkB-SD74:SD-74 株の alkane monooxygenase.

アンダーラインは保存された Hist-1, Hist-2, Hist-3 and HYG モチーフと示す.

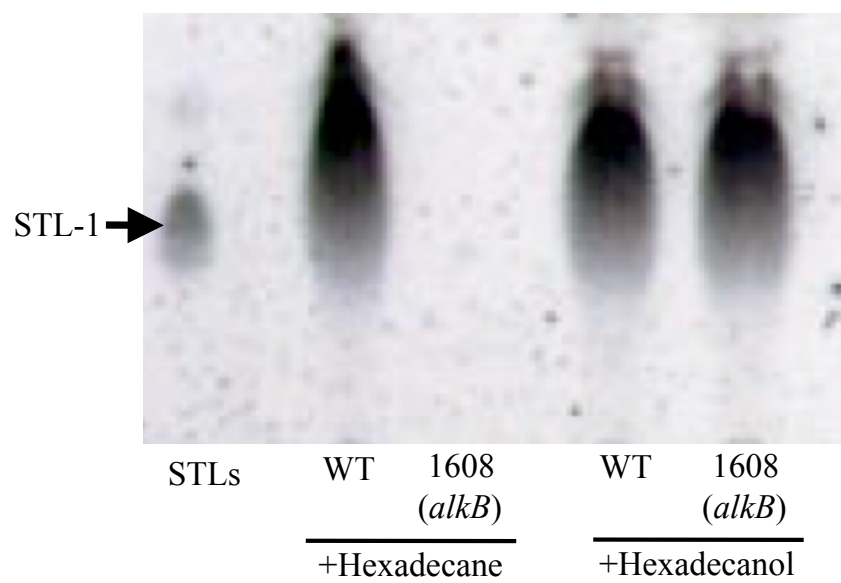


図 3-3-3 *n*-Hexadecanol の添加による STL 生産能の相補試験.
n-Hexadecane および Hexadecanol は終濃度 10% v/v で加えた(井上修論
 2003 より引用, 編集).

推定 **acyl-CoA transferase** が **STL** の生産に必須である。330 株においては、トランスポゾン 1,490 株の ORF からなる配列に挿入されていた (Accession no. AB847084)。この遺伝子(*orf1*)の開始コドンは ATG で、9-bp 上流には SD 配列と推定される配列が存在した。ORF1 のアミノ酸配列はこれまでデータベース上に登録されたものに相同性を示さなかった。しかしながら、ORF1 は **acyl-CoA transferase** の機能に必要な $H_{x3}D_{x14}Y$ モチーフを持っている事が明らかとなった。そこで便宜上 *orf1* 遺伝子には **trehalose lipid synthase** A (*tlsA*) と名前を付けた。*Mycobacterium* 属の *papA1* タンパク質は $H_{x3}D_{x14}Y$ モチーフを保存しており、PapA1 は **acyl-CoA transferase** 活性を持ち、**palmitoyl-CoA** を **trehalose-2-sulfate** に転移させる (32)。この $H_{x3}D_{x14}Y$ モチーフタイプの **acyl-CoA transferase** は放線菌群に属する細菌によく保存されている (表 3-3-3)。この事実から考えると、SD-74 株の TlsA も PapA1 と同様に **Trehalose** もしくはその誘導体にアシル基を転移する活性を有している可能性が挙げられる。これは STL 生合成における最終反応で、もしも $H_{x3}D_{x14}Y$ モチーフが TlsA の活性に必須であるならば、このモチーフの変異は STL の生産能を失わせるはずである。そこで、TlsA の $H_{x3}D_{x14}Y$ モチーフに対して **Histidine** を **Alanine** に (H192A)、**Aspartic acid** を **Alanine** に置換した変異体を作成した (D196A)。さらに $H_{x3}D_{x14}Y$ モチーフ直前の **Aspartic acid** を **Alanine** に置換した変異体も同時に作成した (D191A)。これらの変異体を 330 株に導入し、STL 生産試験を行った。その結果、 $H_{x3}D_{x14}Y$ モチーフへの変異が STL の生産能を欠失させる事が明らかとなった (図 3-3-4)。これらの結果は TlsA の機能が **acyl-CoA transferase** であり、STL 生合成の最終反応を触媒している可能性を支持するものである。

表 3-3-3 acyltransferase のアミノ酸アラインメント

Protein	Species	H position ^b	H _{X3} D _{X14} Y motif region	Residues ^c
PapA1	<i>Mycobacterium bovis</i>	171	SID <u>H</u> LHA <u>D</u> GQFVGVLMEFQSM <u>Y</u> TAL	511
PapA1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	171	SID <u>H</u> LHA <u>D</u> GQFVGVLMEFQSM <u>Y</u> TAL	511
PapA2	<i>Mycobacterium avium</i>	177	SAD <u>H</u> LVI <u>D</u> GMSVGVI F LEIHLT <u>Y</u> AAL	503
PapA2	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	167	SVD <u>H</u> VHV <u>D</u> ATFLGLMLIEIHL <u>M</u> YAAL	480
PapA2	<i>Streptomyces coelicolor</i>	172	AFD <u>H</u> SNV <u>D</u> AYSIIYRIPA E VGEL <u>Y</u> AAG	473
ORF1	<i>Rhodococcus</i> sp. SD-74	192	AID <u>H</u> AHT <u>D</u> MQSMILMFAEIRIS <u>Y</u> QAE	499
			* * *	

^a*は H_{X3}D_{X14}Y モチーフを示す.

^bH_{X3}D_{X14}Y モチーフまでのアミノ酸残基数

^c総アミノ酸残基数

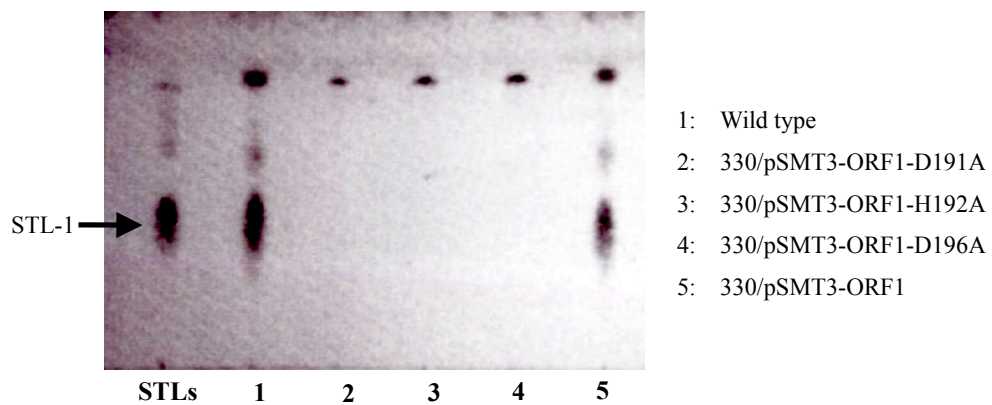


図 3-3-4 $H_{X3}D_{X14}Y$ モチーフ変異体を用いた STL 生産試験. 野生株により生産された STL を lane 1 に示した. 野生型の *tlrA* を相補した場合のみ, STL の生産が回復した(宮崎修論 2006 より引用, 編集).

STL 生合成遺伝子の強発現による STL 生産能力の強化. ここまで、3 つの遺伝子が STL の生産に対して必須である事を示してきた。これら 3 つの遺伝子は STL の直接の生合成に関与している事が強く示唆されており、これらの遺伝子の強発現により STL の生産能力が向上する可能性が考えられる。しかしながら SD-74 株においては特定の遺伝子の発現を任意に調節する事が可能なプロモーターおよびベクターが存在していなかった。これまで見つかった 3 つの遺伝子は STL の生合成に関与するものであり、STL 生産条件下においてはその発現量が平時よりも上昇している可能性が高い。そこでまず始めに、STL 生産条件下において 3 つの生合成遺伝子の発現量比較を行った。転写産物量の定量に際しては 16S rRNA をハウスキーピング遺伝子として用いた。*fda* の転写産物量は STL 生産、非生産条件に関わらずほぼ一定であった (図 3-3-4A)。 *alkB* と *tlsA* については STL 生産条件下で顕著に転写産物量が増加した (図 3-3-4B, C)。特に *alkB* については数十倍の転写促進が見られた。そこで *alkB* のプロモーター領域と推定される領域をクローニングし、STL 生産条件下で特定の遺伝子の発現量を上昇させるベクター、pSMT3-P_{*alkB*} を構築した。このベクターに対して *fda* および *tlrA* をそれぞれクローニングし、*fda*, *tlsA* の強発現ベクターとした。この強発現ベクターを SD-74 株の野生株に導入し、STL の生産量の比較を行った。その結果、*tlsA* 強発現ベクターを有する株において、STL の生産量が 2 倍まで上昇する事が確認された (図 3-3-5)。その一方で *fda* 強発現株においては STL の生産量はむしろ減少した (図 3-3-5)。これらの結果は、現状判明している STL の生合成経路において、最終段階となるアシル基転移反応が全体の系の律速反応となっている可能性を示唆していた。

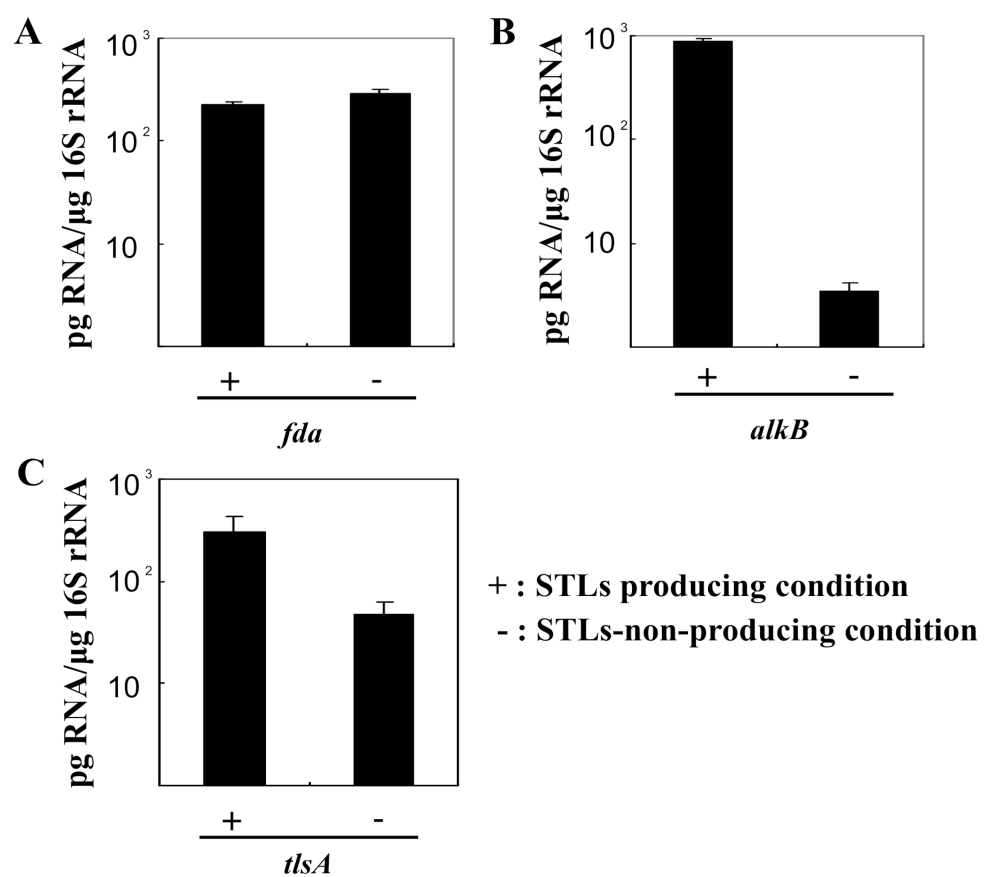


図 3-3-4 STL 生産関連遺伝子の転写産物量. A: *fda*, B: *alkB*, C: *tlsA*, STL 生産条件においては 10%の *n*-Hexadecane を加えている(徳元修論 2009 より引用, 編集).

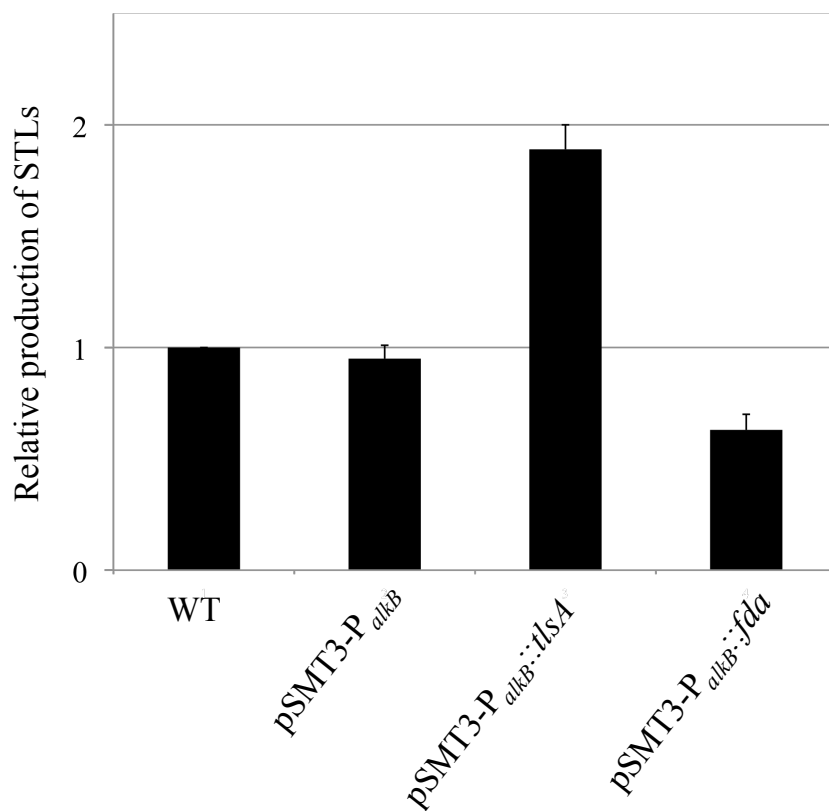


図 3-3-5 強発現ベクターを用いた STL 生合成関連遺伝子強発現株の STL 生産量(徳元修論 2009 より引用, 編集).

第 4 章総括

第 1 章で示すように、本研究の対象となった STL 代表とするトレハロース脂質は非常に多機能な物質である。その汎用性は特筆すべきものがあり、既存の界面活性剤の代替品をはじめとして、今なお深刻な課題であるエネルギー回収、医薬化粧品としての利用などその応用範囲は多岐にわたる事が予想される。*Rhodococcus* 属細菌はトレハロース脂質のメインプロデューサーであり、現在までも多くの *Rhodococcus* 属細菌がトレハロース脂質を生産する事が知られている。それに加え、*Rhodococcus* 属細菌に取ってトレハロース脂質は非常に重要な膜成分である。そういった事実にも関わらず、トレハロース脂質の生合成に関する研究はこれまでほとんど行われてこなかった。こうした背景から、トレハロース脂質の生合成に関わる研究は産業的にも学術的にも重要な研究であると言える。そこで本研究では、他の多くの *Rhodococcus* 属細菌とは異なり多量のトレハロース脂質 (STL) を生産する *Rhodococcus* sp. SD-74 株を対象として、STL の生合成経路の解明を行う事を目的とした。

第 2 章を通して、生合成に関わる遺伝子の探索を行った。探索にはトランスポゾンを用いたランダム遺伝子破壊に依って構築したランダム破壊株ライブラリを用いた。破壊株約 2600 株からのスクリーニングの結果、最終的に STL の生産に必須な遺伝子を 3 種類特定する事に成功した。これらの遺伝子は STL の合成に直接関与している可能性が示され、*Rhodococcus* 属細菌において世界で初めて、トレハロース脂質の合成に関わる遺伝子が特定された。

第 3 章では 3 種類の生合成に関わる遺伝子の機能解析と STL 高生産のための分子育種を行った。3 種類のうちの 1 つは 1 種の遺伝子は *alkane monooxygenase* であった。この遺伝子は *n*-Alkane の酸化酵素であり、*n*-Alkane からのトレハロース脂質 *de novo* 合成において初発の反応を行う最も重要な遺伝子である事が明となった。もう 1 種は糖新生に関わる遺伝子であり *aldolase* 活性を持つ *fructose biphosphate aldolase* である事が明らかとなった。この遺伝子の発見により、*Rhodococcus* sp. SD-74 株は *n*-Alkane より大量の Trehalose を合成する事が可能であることが明らかとなった。さらにもう 1 種の遺伝子は、これまでに報告のあった遺伝子に相同性を示さない新規な遺伝子であった。その機能は

acyl-CoA transferase であると推定された。 *Rhodococcus* 属細菌において Trehalose の修飾酵素が発見されたのは本報告が世界で初めてであり、学術的に重要な発見であると言える。さらに現在工業的に Trehalose の修飾は実現されておらず、親水性の Trehalose に脂溶性を付加するアシル化を触媒する酵素の発見は工業的にも非常に有用な発見であると言える。これら生合成関連遺伝子の発見は、 *Rhodococcus* 属において初めてとなるトレハロース脂質の生合成経路の解明に大きく貢献した。本発見により推定されたトレハロース脂質、STL の推定生合成経路を図 5-1 に示した。

さらにこれら遺伝子の転写産物量を比較する事で、SD-74 株において特定の遺伝子の強発現を可能にするベクターの構築に成功した。加えて、この強発現ベクターを用いて *tlrA* 遺伝子を強発現させる事で STL の生産量を野生株の 2 倍まで増加させる事に成功した。この株の構築により、理論上 STL の生産量は 80 g/l となり商業利用可能とされる生産量である 100 g/l に大きく近づいた。

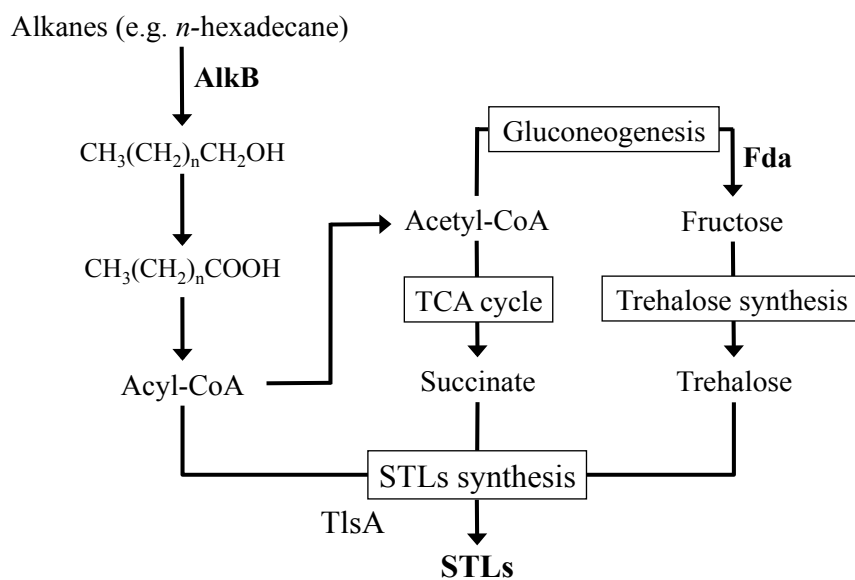


図 5-1 STL の推定生合成経路

本研究により、今まで未知とされてきたトレハロース脂質の生合成、ならびに生産制御系の一端が解明された。この事は STL の産業的実用化のみではなく、*Rhodococcus* 属細菌の生産する他のトレハロース脂質の生産向上へと繋がる発見である。それと同時に、これまでその存在が広く知られていたにもかかわらずその生産や意味について知られる事の無かった *Rhodococcus* 属細菌のトレハロース脂質について、微生物生態学的に新たな知見を与える発見となった。今後ともこの研究を続けて行く事は、産業的にも学術的にも非常に重要であると言えるだろう。

参考文献

1. 谷吉樹, 児玉徹, 倉根隆一郎, バイオサーファクタントの発酵生産とその応用, バイオコンバージョン 医学出版センター, 東京, 1993, pp. 137-150.
2. 北本大, バイオサーファクタント. 油化学., 41, 839-845, 1992.
3. Kitamoto, D., H. Isoda, and T. Nakahara. 2002. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene delivery carriers. J. Biosci. Bioeng., **94**(3):187-201.
4. 角田光雄, バイオサーファクタントとその応用, 機能性界面活性剤～基本特性と効果的な利用技術 株式会社シーエムシー, 東京, 2000, pp. 122-144.
5. Ermolenko, Z. M., V. P. Kholodenko, V. A. Chugunov, N. A. Zhirkova, and G. E. Raulova. 1997. A mycobacterial strain isolated from the oil of the Ukhtinskoe oil field: Identification and degradative properties. Microbiology, **66**:542-545.
6. Rapp, P., H. Bock, V. Wray, and F. Wagner. 1979. Formation, isolation and characterisation of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. J. Gen. Microbiol., **115**:491-503.
7. Nakahara, Y., S. Oka, K. Kaneda, Y. Kato, and I. Yano. 1990. Parallel antitumor, granuloma-forming and tumor-necrosis-factor-priming activities of mycoloyl glycolipids from *Nocardia rubra* that differ in carbohydrate moiety: structure-activity relationships. Cancer Immunol. Immunother., **31**:99-106.
8. Orbach-Arbouys, S., J. P. Tenu, and J. F. Petit. 1983. Enhancement of in vitro and in vivo antitumor activity by cord factor (6-6'-dimycolate of trehalose) administered suspended in saline. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **71**:67-73.
9. Azuma, M., T. Suzutani, K. Sasaki, and I. Yoshida. 1987. Role of interferon in the augmented resistance of trehalose-6,6'-dimycolate treated mice to influenza virus infection. J. Gen. Virol. **68**:835-843.
10. Franzetti, A., I. Gandolfi, G. Bestetti, T. J. P. Smyth, and I. M. Banat. 2010. Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. Eur. J. Lipid Sci. Tech. **112**:617-627.
11. Uchida, U., R. Tsuchiya, M. Chino, J. Hirano, and T. Tabuchi. 1989. Extracellular accumulation of mono- and di-succinoyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes, Agric. Biol. Chem. **53**(3):757-763.
12. Tokumoto, Y., N. Nomura, H. Uchiyama, T. Imura, T. Morita, T. Fukuoka, and D. Kitamoto. 2009. Structural Characterization and Surface-Active Properties of a Succinoyl Trehalose Lipid Produced by *Rhodococcus* sp. SD-74. J. Oleo Sci. **58**:97-102.

13. 鈴木洋, 界面活性物質の種類と構造, 界面と界面活性物質 産業図書, 東京, 1990, pp. 96-112
14. Ishigami, Y., S. Suzuki, T. Funada, M. Chino, Y. Uchida, and T. Tabuchi. 1987. Surface-active properties of succinoyl trehalose lipids as microbial biosurfactants, J. Jpn. Oil Chem. Soc. **36**(11):847-851.
15. Isoda, H., D. Kitamoto, H. Shinmoto, M. Matsumura, and T. Nakahara. 1997. Microbial extracellular glycolipid induction of differentiation and inhibition of the protein kinase C activity of human promyelocytic leukemia cell line HL60. Biosci. Biotech. Biochem. **61**(4):609-614.
16. Uchida, Y., S. Misawa, T. Nakahara, and T. Tabuchi. 1989. Factors affecting the production of succinoyl trehalose lipids by *Rhodococcus erythropolis* SD-74 grown on *n*-alkanes, Agric. Biol. Chem. **53**(3):765-769.
17. Maruta, K., T. Nakada, M. Kubota, H. Chaen, T. Sugimoto, M. Kurimoto, and Y. Tsujisaka. 1995. Formation of trehalose from maltooligosaccharides by a novel enzymatic system. Biosci. Biotech. Biochem. **59**(10):1829-1834.
18. Elbein, D., Y. T. Pan, I. Pastuszek, and D. Carroll. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. Glycobiology. **13**(4):17-27.
19. Oosterom, M. W., F. Rantwijk, and R. A. Sheldon. 1996. Regioselective acylation of disaccharides in tert-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* lipase. Biotechnol. Bioeng. **49**:328-333.
20. Raku, T., M. Kitagawa, H. Shimakawa, and Y. Tokiwa. 2003. Enzymatic synthesis of trehalose esters having lipophilicity. J. Biotech. **100**(3):203-208.
21. 大岳望, 生合成の科学, 新化学ライブラリー, 大日本図書, 1986.
22. Garbe, T.R., J. Barathi, S. Barnini, Y. Zhang, C. Abouzeid, D. Tang, R. Mukherjee, and DB Young. 1994. Transformation of mycobacterial species using hygromycin resistance as selectable marker. Microbiology. **140**:133-138.
23. Komeda, H., Y. Ishii, M. Kobayashi, K. Koizumi, and K. Marubashi. 2001. Improvement of desulfurization activity in *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by genetic engineering. Biosci. Biotech. Biochem. **65**(2):239-246.
24. 菅原健一, 休止菌体法によるサクシノイルトレハロース脂質の生産, 筑波大学第2学群農林学類卒業論文, 1986.
25. Kitamoto, D, T Morita, T. Fukuoka, M. Konishi, and T. Imura. 2009. Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. Curr. Opin. Colloid

- Interface Sci. **14**:315–328.
26. Morris, DL. 1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science*. **107**:254 –255.
 27. Fernandes, P.J., and J. A. C. Archer. 2001. Construction of *Rhodococcus* random mutagenesis libraries using Tn5 transposition complexes. *Microbiology*. **147**:2529-2536.
 28. Oosterom, M. W., F. Rantwijk, and R. A. Sheldon. 1996. Regioselective acylation of disaccharides in tert-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* lipase. *Biotechnol. Bioeng.* **49**:328-333.
 29. Woodruff, P. J., B. L. Carlson, B. Siridechadilok, M. R. Praff, R. H. Senaratne, J. D. Mougous, L. W. Riley, S. J. Williams, and C. R. Bertozzi. 2004. Trehalose is required for growth of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biotech.* **279**(28):28835-28843
 30. Rutter, W. J., J. R. Hunsley, W. E. Groves, J. Calder, T. V. Rajkumar, and B. M. Woodfin. 1966. Fructose diphosphate aldolase. *Methods Enzymol.* **9**:479 – 498.
 31. Sambrook, J., and D. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
 32. Kumar, P., M. W. Schelle, M. Jain, F. L. Lin, C. J. Petzold, M. D. Leavell, J. A. Leary, J. S. Cox, and C. R. Bertozzi. 2007. PapA1 and PapA2 are acyltransferases essential for the biosynthesis of the *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor Sulfolipid-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**:11221–11226.
 33. He H. J., R. Hovey, J. Kane, V. Singh, and T. C. Zahrt. 2006. MprAB is a stress-responsive two-component system that directly regulates expression of sigma factors SigB and SigE in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.*, **188**:2134-2143.

謝辞

本研究を遂行するに当たり，終始暖かい激励と御指導を賜りました
筑波大学 生命環境系 教授 野村暢彦博士に厚く御礼申し上げます．

本研究における諸実験に対し，適切な御指摘を賜りました
筑波大学 生命環境系 名誉教授 内山裕夫博士，
筑波大学生命環境系准教授 中島敏明博士に厚く御礼申し上げます．

博士論文の作成に当たり，適切な御助言を賜りました
筑波大学生命環境系教授 高谷直樹博士，筑波大学生命環境系准教授 橋本義輝博士，
筑波大学生命環境系准教授 山路恵子博士に厚く御礼申し上げます．

本研究の遂行に当たり，御指導，御協力を賜りました筑波大学生命環境系助教 豊福
雅典博士，尾花望博士，井上直樹様，宮崎勇介様，徳元勇太様に厚く御礼申し上げます．

筑波大学微生物機能利用学研究室の古川理恵様には，研究に専念出来るよう様々な御
支援を頂き，厚く御礼申し上げます．

微生物機能利用学研究室の皆様には，研究生活における様々な場面で支えて頂き，心
より感謝申し上げます．

付記

本研究の一部は下記の学術雑誌において発表された.

Tomohiro Inaba, Yuta Tokumoto, Yusuke Miyazaki, Naoyuki Inoue, Hideaki Maseda, Toshiaki Nakajima-Kambe, Hiroo Uchiyama and Nobuhiko Nomura. Analysis of Genes for Succinoyl Trehalose Lipid Production and Increasing Production in *Rhodococcus* sp Strain SD-74. *Applied and Environmental Microbiology* **79**:7082-7090. (2013)

本研究の一部は下記の学術会議において発表された.

1. ○**Tomohiro Inaba, Yuta Tokumoto, Yusuke Miyazaki, Naoyuki Inoue, Toshiaki Nakajima, Hiroo Uchiyama and Nobuhiko Nomura,** Analysis of Genes for Succinoyl Trehalose Lipid Production and Secretion of *Rhodococcus* sp. SD-74, Asia Oceania Geochemical Society 2010, OS04-12-A001 (Hyderabad, India) (July, 2010)